



دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی کرمان

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته ژنتیک انسانی

عنوان:

بررسی ژنتیکی ناشنوایی غیر سندرومی با استفاده از تکنیک MLPA در کرمان

توسط

منوچهر جاوید

اساتید راهنما

دکتر محمد رضا بذرافشانی دکتر احمد انجم شعاع

سال تحصیلی: (شهریور ۹۸)

شماره پایان نامه: (۵۶۸)

تاریخ: ۹۸/۷/۳۰

شماره: ۹۸۳۵۹۱

کد اخلاق: ۱۳۹۶/۱۹۱۸

بسمه تعالی

صور تجلسه دفاع از پایان نامه



دانشگاه علوم پزشکی کرمان

تحصیلات تکمیلی دانشگاه

جلسه دفاعیه پایان نامه آقای منوچهر جاوید کارشناسی ارشد رشته ژنتیک انسانی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان تحت عنوان "پرسی ژنتیکی ناشنوایی غیر سندرومی با استفاده از تکنیک MLPA در کرمان" در ساعت ۸ روز چهارشنبه مورخ ۹۸/۷/۳ با حضور اعضای محترم هیات داوران متشکل از:

سمت	نام و نام خانوادگی	امضا
الف: استاد راهنما (اول)	جناب آقای دکتر محمدرضا بذر افشان	
ب: استاد راهنما (دوم)	جناب آقای دکتر احمد انجم شعاع	
ج: استاد مشاور	_____	
د: استاد مشاور (دوم)	_____	
د: عضو هیات داوران (داخلی)	سرکار خانم دکتر کلثوم سعیدی	
ذ: عضو هیات داوران (خارجی)	جناب آقای دکتر محمدهادی نعمت الهی	
ر: نماینده تحصیلات تکمیلی	سرکار خانم دکتر مرآت محمودی	

تشکیل گردید و ضمن ارزیابی به شرح پیوست با درجه خوب و نمره ۱۶/۸۴ مورد تأیید قرار گرفت.

مهر و امضاء معاون آموزشی
دانشگاه علوم پزشکی کرمان
دانشکده پزشکی
پروفسور

چکیده

مقدمه و اهداف: نقص شنوایی یکی از شایع ترین نقص های حسی_عصبی، با شیوع ۱ در ۱۰۰۰ در دنیا و ۱ در ۱۶۶ نوزاد در ایران، می باشد و بیش از ۵۰٪ از این موارد ارثی است. عوامل ژنتیکی مسئول ۷۰٪ موارد غیر سندرومی این بیماری هتروژن بوده و تاکنون جهش در ژن های زیادی در ارتباط با اتیولوژی این بیماری شناسایی شده اند. جهش های حذفی و مضاعف شدگی در ژن های مرتبط با ناشنوایی غیر سندرومی از انواع شایع جهش های مرتبط با این بیماری محسوب گردیده که با روش های توالی یابی مرسوم قادر به تشخیص نیستند. تکنیک MLPA یک روش ساده، نسبتاً کم هزینه و قدرتمند برای تشخیص جهش های حذفی/مضاعف شدگی و حتی نقطه ای محسوب می گردد که بر خلاف روش های مرسوم PCR، پروب های فلئوروسنس استفاده شده برای هر توالی اختصاصی تکثیر و بر اساس اندازه جداسازی می شوند. ما در این طرح با شناسایی و بررسی جهش های ۵ ژن شایع در ارتباط با ناشنوایی غیر سندرومی یعنی ۳ ژن کانکسین (*GJB2*، *GJB3* و *GJB6*)، ژن *POU3F4* و ژن *WFS1* با استفاده از تکنیک MLPA، در جمعیت جنوب شرق کشور قصد داریم فراوانی جهش های این ژن ها را به دست بیاوریم تا گام مثبتی در جهت مشاوره های ژنتیک قبل از ازدواج و بارداری و کاهش شیوع این بیماری در این منطقه برداشته شود.

روش ها: خون محیطی از ۱۰۰ بیمار با ناشنوایی غیر سندرومی و ۱۰ فرد سالم بدون سابقه خانوادگی ناشنوایی (نمونه های رفرنس) جمع آوری شد. بعد از استخراج DNA، واکنش MLPA برای بیماران و نمونه های رفرنس انجام، داده های خام با استفاده از تزریق نمونه ها به الکتروفورز موئینه Genetic Analyzer 3130 جمع آوری و نتایج توسط نرم افزار GeneMarker آنالیز گردید. فراوانی جهش ها با نرم افزار SPSS محاسبه گردید.

یافته ها: از میان ۱۰۰ بیمار، فقط ۴۰ مورد دارای جهش در ۵ ژن مورد مطالعه بودند. با احتساب حالات هتروزیگوت و هوموزیگوت، ۷۴ جهش ریز حذفی، ریز مضاعف شدگی و نقطه ای در بیماران مشاهده گردید. تمام بیماران دارای جهش در ژن *POU3F4* مذکر بوده و ۵۸٪ ازدواج ها به صورت خویشاوندی بودند.

بحث و نتیجه گیری: فراوانی جهش های ژن *GJB2*، *GJB3*، *GJB6*، *POU3F4* و *WFS1* به ترتیب ۵/۱۰٪، ۶٪، ۳/۵٪، ۱۹٪ و ۷٪ که بیشترین سهم جهش ها در بین پنج ژن مورد بررسی، مربوط به ژن *POU3F4*

می باشد. جهش های ریز حذفی ۷۴/۳٪ و جهش های نقطه ای ۹/۵٪ به ترتیب بیشترین و کمترین سهم را در بین جهش ها داشتند. جهش نقطه ای 35delG در ژن *GJB2* برخلاف فرکانس بالای آن در دیگر نقاط، در منطقه جنوب شرق فراوانی پایینی داشت (۱٪). با توجه به اینکه فقط حدود ۴۰٪ افراد بیمار دارای جهش هایی در این ۵ ژن بودند، لذا برای هرچه کامل تر شدن گزینه های مشاوره ای و تشخیص برای ناشنوایی غیر سندرومی، بررسی جهش های دیگر ژن ها با روش های دیگر توصیه می گردد.

کلمات کلیدی: ناشنوایی غیر سندرومی، MLPA، ژن کانکسین، ژن *POU3F4*، ژن *WFS1*، استان

کرمان. **Abstract.**

Introduction and Objectives: Hearing impairment (HL) is one of the most common sensory-neural defects with a prevalence of 1 in 1,000 in the world and 1 in 166 infants in Iran. More than 50% of HL are hereditary. Genetic factors are responsible for 70% of non-syndromic cases of this heterogenic disease, and mutations in many genes have been identified so far. The deletion and duplication mutations in non-syndromic hearing impairment related genes are among the most common types of mutations that cannot be detected by conventional sequencing methods. The MLPA technique is a simple, relatively inexpensive and robust method for detecting deletions/duplications and even point mutations. In this study, we identified and evaluated the mutations of the five common genes associated with non-syndromic deafness, namely, three Connexin genes (*GJB2*, *GJB3*, and *GJB6*), *POU3F4* and *WFS1* genes using MLPA technique in the southeastern population of IRAN. We aimed to estimate the mutation frequencies of these genes in order to take an effective step towards genetic counseling before marriage and pregnancy and to reduce the incidence of this disease in the area.

Methods: Peripheral blood of 100 patients with non-syndromic deafness and 10 healthy individuals without familial history of deafness (reference samples) were collected. After DNA

extraction, the MLPA reaction was performed; raw data were obtained by 3130 Genetic Analyser and the results were analyzed by GeneMarker software.

Results: Among 100 patients, only 40 cases had mutations in the 5 studied genes. Considering the heterozygote and homozygous states, we totally found 74 mutations including micro duplication, micro deletion and point mutation in patients. All cases with mutations in *POU3F4* gene were males and 58% of marriages were consanguineous.

Discussion: The mutation frequency of *GJB2*, *GJB3*, *GJB6*, *POU3F4*, and *WFS1* genes were calculated 10.5%, 6.5%, 3.5%, 19%, and 7%, respectively. Unlike the previous studies, *POU3F4* gene had the highest mutation frequency in this study. Also, we found that 74.3% of mutations were microdeletion and only 9.5% of them were point mutation. Unlike high frequency in other area, the 35delG point mutation in the *GJB2* gene, had a low frequency in the south-east region of IRAN (1%). Regarding that only 40% of the patients had mutations in these five genes, so to achieve more complete genetic counseling and diagnostic options for NSHL, analyzing of other mutations in other related genes are recommended.

Keywords: NSHL, MLPA, Connexin genes, *POU3F4* gene, *WFS1* gene, Kerman province.



**KERMAN UNIVERSITY
OF MEDICAL SCIENCES**

Faculty of Medicine

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree MSc

Title

**Investigation of non-syndromic hearing loss genetics using MLPA technique in
Kerman province**

By

Manouchehr javid

Supervisors

1- Dr. Mohammadreza Bazrafshani 2- Dr. Ahmad Anjom shoa

Thesis No : (568)

Date (September, 2019)